

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## ⑪ 公開特許公報 (A)

平2-84175

⑤Int.Cl.<sup>5</sup>

C 12 N 5/16  
 C 12 P 21/08  
 // A 61 K 39/395  
 C 12 N 15/06  
 (C 12 P 21/08  
 C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成2年(1990)3月26日

N 6712-4B  
8829-4C

審査請求 未請求 請求項の数 16 (全18頁)

⑤発明の名称 人フィブリノペプチドAに特異な単クローニ性抗体

⑪特 願 平1-145543

⑫出 願 平1(1989)6月9日

優先権主張 ⑬1988年6月10日 ⑭米国(US)⑮206150

⑬1988年6月13日 ⑭米国(US)⑮206249

⑭発明者 ボーダン・ジエイ・ク 米国ニュージャージー州リトル・フエリー、リバティ・ストリート 1  
ドリク⑭出願人 ニューヨーク・プラット  
ド・センター・インコ  
一ポレイテツド  
米国10021ニューヨーク州ニューヨーク、イースト・シク  
ステイセブンス・ストリート 310

⑭代理人 弁理士 倉内 基弘 外1名

## 明細書

と接触させ、そして

(c) 標識をアッセイすることを含む逆離hFPAを測定する方法。

(4) 血漿サンプルがフィブリノゲンを除去するために処理されていない請求項3に記載の方法。

(5) 標識した Tyr誘導体が I<sup>125</sup>-Tyr-hFPAである請求項3に記載の方法。(6) フラグメントが A<sup>α</sup>7-16 である請求項3に記載の方法。

(7) 標識した hFPAが hFPA-HRPO である請求項3に記載の方法。

(8) (a) A<sup>α</sup>7-16、hFPA及びhFPAP からなる群から選ぶペプチドを固定化し、

(b) 標識した請求項1に記載の単クローニ性抗体及び血漿サンプルを培養し、

(c) (a) のペプチドを得られた (b) の培養混合物に接触させ、

(d) 標識をアッセイすることを含む逆離hFPAを測定する方法。

(9) 標識した単クローニ性抗体の標識がホルセ

## 1. 発明の名称

人フィブリノペプチドAに特異な単クローニ性抗体

## 2. 特許請求の範囲

(1) 人フィブリノペプチドAに特異性であるが、完全なフィブリノゲンかあるいは人フィブリノペプチドA含有フィブリノゲンフラグメントのいずれかと反応しない単クローニ性抗体を分泌するハイブリドーマ。

(2) 請求項1に記載したハイブリドーマにより分泌された単クローニ性抗体の特異性を有する単クローニ性抗体。

(3) (a) 請求項1に記載した単クローニ性抗体を固定化し、

(b) (a) からの固定化した単クローニ性抗体を、標識した hFPAペプチドまたは標識したそのフラグメントまたはその Tyr誘導体、及び血漿サンプル

ラディッシュペロキシダーゼである請求項8に記載の方法。

(10) 上記固定化の前に、さらに上記ペプチドを担体に結合して複合体を形成することを含む請求項8に記載の方法。

(11) 少なくとも一つの容器中に、

(a) 固定化した請求項1に記載の単クローニ性抗体、及び

(b) 標識したhFPAペプチドまたは標識したそのフラグメントまたは標識したそのTyr誘導体を含む遊離hFPAの測定用キット。

(12) 標識したTyr誘導体が $I^{125\text{-}}\text{Tyr-hFPA}$ である請求項11に記載のキット。

(13) フラグメントが $A\alpha 7-16$ である請求項11に記載のキット。

(14) 標識したhFPAがhFPA-HRP0である請求項11に記載のキット。

(15) 少なくとも一つの容器中に、

(a)  $A\alpha 7-16$ 、hFPA及びhFPAPからなる群から選ぶペプチドを担体に結合して含むペプチド複合

体、

(b) 請求項1に記載の標識した単クローニ性抗体を含む遊離hFPAを測定するキット。

(16) 標識した単クローニ性抗体の標識がホルセラディッシュペロキシダーゼである請求項15に記載のキット。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 【産業上の利用分野】

本発明は、人フィブリノペプチドA(hFPA)に特異性であるが、完全なフィブリノゲンかまたは人フィブリノペプチドA含有フィブリノゲンフラグメントかのいずれかと反応しない単クローニ性抗体(MabまたはFabまたはFab')を分泌するハイブリドーマに関する。また、本発明は、そのような単クローニ性抗体を使用して血漿中、特に完全な(intact)血漿(フィブリノゲンを除去するために処理されていない血漿)中の遊離hFPAの量を測定する方法に関する。

#### 【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

フィブリノゲンは3つの同一でないポリペプチド鎖より構成された巨大な( $M_r 340000$ )2量体の分子である。フィブリノゲンからフィブリンへの転移はフィブリノペプチドの逐次放出を含む。この二段階のトロンビンを媒介としたプロセスにおいて、フィブリンIは初期生成物であり、それはFPA(フィブリノペプチドA( $A\alpha 1 \sim 16$ ))を放出した後に形成される。一層コンパクトな構造であるフィブリンIIは、FPB(フィブリノペプチドB( $B\beta 1 \sim 14$ ))を放出した際に生じる(プロムバック(Bloombäck)ら、Nature, Lond., 251, 501-505, (1978))。

酵素トロンビンは610アミノ酸フィブリノゲンの $A\alpha$ 鎖をアミノ酸の16Arg-17Gly結合にて分裂させてるので、hFPAを測定することは、生体内のトロンビン活性の測定における有益な標識として働く。

フィブリノゲンからのフィブリノペプチドAの放出は血栓症の最も初期の段階に伴うものなの

で、血漿試料中のhFPAのレベルを直接測定することができるアッセイを有することが有利である。

プロムバックらにより決定された通りの人フィブリノペプチドA(hFPAまたは $\alpha 1 \sim 16$ )のアミノ酸配列は以下の通りである：

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11  
Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-  
12 13 14 15 16  
Gly-Gly-Gly-Val-Arg

(プロムバック, B. ., プロムバック, M. ., エドマン(Edman), P. ., ヘセル(Hessel), B. ., の“人のフィブリノペプチドの分離、特性及び構造”、Biochim. Biophys. Acta., 115, 371, (1966年))

ウイルナー(Wilner)らは、以前にhFPAに対する免抗体の一群に関する抗原性決定基またはエピトープがペプチドのCOOH-末端領域( $A\alpha 1 \sim 16$ )中に含まれることを示した(ウイルナー、G. D. ., ノセル(Nossel), H. L. ., キャンフィールド(Canfield), R. E. ., バトラー(Butler), V. P. ., ジュニアの“合成ペプチド

相同体を用いる人フィブリノペプチドの免疫化学的研究”、生化学、15、1209、(1976年)。

さらに、Asp-7, Phe-8 及び Arg-16は免疫反応性に重要な寄与していること及び完全なフィブリノゲン及びhFPA含有フィブリノゲンフラグメントがかかる抗体に極めてわずかしか反応しないことが確認された。

従来、全てでないとしても、遊離の人フィブリノペプチドAと反応した殆どのポリクローン抗体はまた血漿とも反応し、すなわちかかる抗体は、それゆえ、hFPAに関して区別することができなかった。

ハイブリドーマ技術の開発は、コーラー (Kohler) 及びミルスティン (Milstein) の ネイチャー、256、495-497、1975年により、既にフィブリノゲン分解生成物を処理する免疫アッセイの殆どの一層かつ実質的な改善を導いてきており、そして未だ、かかる改善を導き得る。

コーラー (Kohler) 及びミルスティン (Milstein) は、初めて、免疫化したマウスからの脾臓細胞に

理解されているが、各々の特定の場合における多くの困難及び変動がある。

実際には、所定のハイブリドーマを製造する試みの前に、所望のハイブリドーマが得られ、もし得られるならばそれが抗体を産生し、またはそうして産生された抗体が特異性を有するという保証はない。成功の度合いは、主に、用いる抗原のタイプ及び所望のハイブリドーマを分離するために用いる選択技術により影響を受ける。

他のグループは  $\text{A} \alpha$  - 領の  $\text{NH}_2$  - 端領域に向かう单クローン性抗体を製造した。これらの内のいくつかは潜在的に臨床的なプローブに有用となり得る。ドーズ (Dawes) ら (ドーズ (Dawes), J., ドラ蒙ド (Drummond), O., ミックレム (Mickle), L.R., マクカーン (McCann), M.C., ジェームス (James), R., の “フィブリノペプチドAに対する单クローン性抗体はすべてフィブリノゲンと交差反応しない”、Thromb. Haemost.、54、41、(1985年) (抄録) ) は、hFPAと感作した20匹のマウスの内11匹において、正ではあるが、非常に低

マウスの骨髓細胞を融合することが单クローン性抗体を作成する連続細胞系を得ることを可能にすることを立証した。その結果、多大な努力が種々のハイブリッド細胞 (ハイブリドーマ) の製造及びこれらのハイブリドーマにより作られた抗体の使用に向けられてきた。例えば、F. メルチャー (Welchers), M. ポター (Potter) 及び N. バーナー (Warner) 著の 微生物及び免疫学における最近のトピックス、81、 “リンパ球ハイブリドーマ”、Springer-Verlag, 1978年及びそこに載っている文献: C.J. バーンステイブル (Barnstable) らの 細胞 (Cell)、11、14-9-20、1978年5月; P. パルハム (Parham) 及び W.F. ボッドマー (Bodmer)、ネイチャー (Nature)、276、397-399、1978年11月; D.W. ワイヤー (Wier) 著の 実験免疫学ハンドブック、第3版、2、ブラックウェル (Blackwell), 1978年、チャプター25: 及び 化学及び工学ニュース、1979年1月1日、15-17を参照のこと。これらの文献はハイブリドーマから单クローン性抗体を製造する試みにおいて内在する問題を指摘している。一般的な技術は十分に

い力値の血清を得た。マウスの脾臓細胞と NS-1骨髓細胞の融合の後、十分な数のハイブリドーマ (36/319) が放射性標識したhFPAと結合する抗体を産生した。殆どの抗体が FPA 及びフィブリノゲンと等価に十分に反応したにも拘らず、いくつかのものは遊離ペプチドに関して高い特異性を表わすことが確認された。MAb/ESF9で示されたこれらの一つは、標識化した FPA による放射性免疫アッセイにおいて用いられてきた。これらのアッセイからの結果は過剰のフィブリノゲンがリガンドの MAb/ESF9への結合を有意に抑制することができないことを示した。

放射性免疫アッセイ及び異なる抗体 (MAb/ESF1) を用いて、ドーズと彼の共同研究者は人かあるいはアカゲザルかのいずれかのフィブリノゲンに由来する FPA の間でわずかだけの交差反応性を示した。かかる結果は、両方の種からの FPA が寸法 (16 アミノ酸残基) において一致し且つ单一残基のみにより構造が異なる (人において  $\text{A} \alpha 3 \text{ Ser}$ 、サルにおいて  $\text{A} \alpha 3 \text{ Thr}$ ) という点で

極めて興味を起こさせる。

Mab/Y18 と表示される一つ他の抗体 (IgM イソタイプ) は、近年、予めフラグメント-Y により免疫化した動物からの脾臍細胞を用いた融合実験から製造された (コパート, P. W., ホイツマンズ (Huijsmans), C. M. G., ニューベンホイツエン (Nieuwenhuizen), W. の "人フィブリノゲン、フィブリノペプチド A 含有フラグメントに特異性であるが、遊離フィブリノペプチド A と反応しない単クローニング性抗体", 血液, 66, 503, (1985年))。

Mab/Y18 は同様にフィブリノゲン、Fg-X, Fg-Y, N-DSK, A  $\alpha$ -鎖並びに A  $\alpha$  1-51 と反応することが報告されてきた。頂度同定された抗原のいずれかがトロンビンまたはトロンビン類似酵素で消化されるとき、抗体とのすべての免疫反応性が壊滅するので、所望のプローブが向かうエピトープは酵素感受性 A  $\alpha$  16Arg-17Gly 結合の内部または周囲に存在し得る。いくつかの異常なフィブリノゲンによる研究に基づき、コパート (Koppert) 及び彼

必要がない、すなわち完全な血漿を用いることができる遊離 hFPA のアッセイを提供することにある。

上記目的、並びに他の目的、目標及び利点は本発明により満たされる。

本発明は人フィブリノペプチド A に特異性であって、遊離の人フィブリノペプチド A と反応するが、完全なフィブリノゲンまたは人フィブリノペプチド A 含有フィブリノゲンフラグメント、例えばフィブリノゲンの A  $\alpha$  鎖と反応しない単クローニング性抗体を分泌するハイブリドーマに関する。また、本発明は、完全な血漿中の遊離 hFPA を迅速に測定するためのいくつかのコンペティティブアッセイに関する。

最初のアッセイにおいて、本発明に従う単クローニング性抗体を、例えば、マイクロタイタブレート上に塗布して固定化する。例えば、4 °C で一晩、培養した後、その後、固定化した抗体を放射性標識した hFPA ベプチドまたはそのフラグメントまたはその Tyr 誘導体、例えば、酵素標識した hFPA、

の共同研究者は FPA の NH<sub>2</sub>-の末端部分、並びに A  $\alpha$  16Arg が Mab/Y18 が向かうエピトープの本質的な成分であることを結論付けた (コパート, P. W., ホイツマン、C. M. G., ニクベンホイツエン、W. の "人フィブリノゲン、フィブリノペプチド A 含有フラグメントに特異性であるが、遊離フィブリノペプチド A と反応しない単クローニング性抗体", 血液, 66, 503, (1985年))。また、これらの同じ研究者により製造されたネオエピトープ (neoepitope) 特異性抗体と組み合わせたこの抗体は、現在、フィブリノゲンかまたはフィブリノペプチド A に由来する分解生成物を測定しそしてそれらの間を区別するのに用いられる。

#### 発明の概要

本発明の目的は hFPA に特異性の単クローニング性抗体を分泌するハイブリドーマを提供することにある。

本発明の別の目的は、遊離 hFPA 用のアッセイを提供することにある。

本発明の別の目的は、血漿サンプルを処理する

例えば、hFPA-HRPO, (HRPO=ホルスラディッシュペルオキシダーゼ) または放射性標識した Tyr-hFPA、及び血漿試料 (または hFPA 定量が望まれるいずれかの試料) に接触させる。培養しそして洗浄した後、標識を測定する (ELISA の場合、色強度を測定) 測定する。"コールド (cold)" (未標識の) 材料が多いほど、結合が少くなりそしてそのため色が薄くなる (ELISAにおいて)。

2 番目のアッセイにおいて、抗原、すなわち、hFPA ベプチドまたはそのフラグメントまたはその Tyr 誘導体を、好みしくは、担体、例えばオバルブミンに結合して複合体を形成したもので固定化する。その後、発明に従う標識した単クローニング性抗体及び試料例えば、血漿試料を培養しそしてその後固定化した抗原と接触させる。その後、標識のアッセイを実行する。色が濃いほど (ELISAにおいて)、試料中に存在する hFPA は一層少なくなる。

#### 略語の定義

A  $\alpha$  7-16 (a):バイオサーチ (Bioresearch) 社 (サン

ラファエル、カリフォルニア州) より得られるデカベプチド

A<sub>α</sub>7-16(a)-ポリ-D-Glu [CDI]: バイオサーチ社の、カルボジイミド処理したポリ-D-グルタミン酸に結合したデカベプチド

A<sub>α</sub>7-16(a): 手作業で合成したデカベプチド

dFbg: 犬フィブリノゲン

dXL-Fn: 犬架橋したフィブリン

hFbg: 人フィブリノゲン

hFg-E[CDI]: カルボジイミド処理した人フィブリノゲンフラグメント E

hFPA: 人フィブリノベプチド A (A<sub>α</sub>1-16)

hFPA-HRPO: 免疫アッセイ用に用いた人フィブリノベプチド A-ホルセラディッシュペロキシダーゼ複合体 (コンジュゲート)

hFPA/hFPB-ova1b.[CDI]: カルボジイミド処理したニワトリ卵のオバルブミンと複合した人フィブリノベプチド A 及びフィブリノベプチド B

hFPAp: リン酸化した形態の Ser-3 を持つ人フィブリノベプチド A (A<sub>α</sub>1-16)

hFPA-hFg-E[CDI]: カルボジイミド処理した人フィブリノゲンフラグメント E に複合したリン酸化した人フィブリノベプチド A

HPLC: 高性能液体クロマトグラフィー

hXL-Fn: 人架橋したフィブリン

i.p.: 腹腔内注射

i.v.: 静脈注射

MAb または Fab または MAB: 単クローニング抗体

MAB/8C2-5: ハイブリドーマ 8C2 のクローニング (サブクローニング #5) により分泌された抗体

MAB/8C2-HRPO: 免疫アッセイに用いる抗体-ホルセラディッシュペロキシダーゼ複合体

ova1b[CDI]: カルボジイミド処理したニワトリ卵のオバルブミン

ova1b: ニワトリ卵のオバルブミン

R.: HPLC による保持時間

Tyr-A<sub>α</sub>1-16: N-チロシルフィブリノベプチド A

Tyr-A<sub>α</sub>1-21: A<sub>α</sub>1-21 の N-チロシル誘導体

Tyr-A<sub>α</sub>7-16(a): アブライドプロテインテクノロジー (ケンブリッジ、マサチューセッツ州)

より得られたデカベプチドの N-チロシル誘導体

ELISA: 酵素結合免疫吸着アッセイ (エライサ)

RIA: 放射性免疫アッセイ

Buffer A-5 (放射性免疫アッセイで用いる): ダルベッコ (Dulbecco) の、0.1% Na<sub>3</sub>及び 1.0 mg/ml のオバルブミン (結晶化した、グレード V、シグマ (Sigma)、セントルイス、ミズーリ州) を含むリン酸緩衝食塩水 (D-PBS、ギブコ (Gibco)、ラボラトリーズ、グランド・アイランド、ニューヨーク州)

Buffer A-5B: (ELISA において用いた): ダルベッコの、1.0 mg/ml のオバルブミン (結晶化した、グレード V、シグマ (Sigma)、セントルイス、ミズーリ州) を含むリン酸緩衝食塩水 (D-PBS、ギブコ、ラボラトリーズ、グランド・アイランド、ニューヨーク州)。緩衝液は使用直前にフレッシュにする。

緩衝液 "NID" (免疫プロット法 (immunoblotting) に用いた): 10 mM トリス、150 mM の NaCl、0.1% Na<sub>3</sub>、50U/ml アプロチニン ("Trasylol")。

モベイ (Mobay) ケミカル社、ニューヨーク、ニューヨーク州)、1 μg/ml の大豆トリプシンインヒビター (ポルシントン (Worthington) バイオケミカルコーポレーション、フリードホールド、ニュージャージー州)、0.87 μM PPACK (D-フェニルアラニル-L-プロリル-L-アルギニンクロロメチルケトン、カルバイオケム-ベーリング (Calbiochem-Behring) 社、ラ・ジョーラ、カリフォルニア州)、pH7.4

#### アミノ酸の略語

A s p: アスパラギン酸

A s n: アスパラギン

T h r: スレオニン

S e r: セリン

G l u: グルタミン酸

G l u: グルタミン

P r o: プロリン

G l y: グリシン

A l a: アラニン

C y s: シスチイン

V a l : バリン  
 M e t : メチオニン  
 I l e : イソロシン  
 L e u : ロイシン  
 T y r : チロシン  
 P h e : フェニルアラニン  
 T r p : トリプトファン  
 L y s : リシン  
 H i s : ヒスチジン  
 A r g : アルギニン

一般に、本発明に従う単クローニング抗体を発するハイブリドーマはコーラー及びミルスティンの方法によって製造される。動物、例えば、マウスを、オバルブミンに結合（複合）した  $A\alpha 7-16$  デカペプチドの溶液により免疫化した後、該免疫化した動物の脾臓細胞を、動物、例えば、マウスからの細胞、例えば骨髄腫細胞系 P 3 X 63 Ag8.653 と融合する。得られたハイブリドーマからのクローニング培養液を、所望の選択的結合をもたらす抗体

本発明に従うハイブリドーマを製造する方法は、一般には以下の段階を含む：

A. マウスを  $A\alpha 7-16$  デカペプチドのオバルブミン複合体により免疫化する。BALB/cJ マウスが好みだが、他のマウス株を用いることができる。免疫化スケジュール及び免疫原濃度は、適当に活性化された脾臓細胞の有用な量を生成するようすべきである。マウスの腹腔内を  $A\alpha 7-16$  複合体溶液及び完全フロイントアジュvant の適当容量のエマルジョンにより免疫化して次いで週間隔での不完全フロイントアジュvant を用いて同一投与量の 4 回の追加免疫注射を行ない、次いで 10 週間後にトリス生理食塩水中の  $A\alpha 7-16$  を用いて静脈内免疫追加を行なうことが好み。

B. 各々の免疫化したマウスから脾臓を取り出し、適当な媒体、例えば、RPMI1640 中各々の脾臓からの細胞の懸濁液を作成する。

C. 懸濁した脾臓細胞と好適な細胞系からのマウス骨髄腫細胞を、例えば、好適な融合促進剤、例えば PEG1000 を使用することによって融合す

を含む上澄みを有する液に関してスクリーニングする。

発明の方法により製造した、ハイブリドーマ由來の単クローニング抗体は、血栓症が差し迫ったまたは血栓症の徵候が現われた患者の血液中の遊離 hFPA の存在を測定するための診断試薬として有用である。血栓症は多くの病状に伴うが、また、外科手術の前、間または後に並びに他の外傷状態において起こり得る。また、血液透析患者用のヘパリン治療の効能は、発明の診断試薬を通じて hFPA の血漿濃度を測定することによって検査することができる。

本発明に従うハイブリドーマ及びかかるハイブリドーマにより発しられた抗体を製造する方法は、骨髄腫細胞のような形質転換動物細胞を動物の脾臓細胞に融合することにより実施することができる。しかしながら、マウスの骨髄腫細胞及びマウスの脾臓細胞を用いることが好ましく、それゆえ、この後、本発明を、マウスの骨髄腫細胞及びマウスの脾臓細胞を用いて記載する。

る。好みの比は、骨髄腫細胞当たり脾臓細胞約 4 ~ 7 である。融合媒体の約 0.5 ~ 1.0 ml の全容量は約  $10^8$  の脾臓細胞にふさわしい。多くのマウス骨髄腫細胞系は知られておりそして一般には、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) 、ロックビル、メリーランド州、またはサルク (Salik) 、インスチチュート・セル・ディス・トリビューション・センター、ラジャラ、カリフオルニア州のような学術団体または種々の寄託銀行の会員から入手可能である。好み用いる細胞系はいわゆる“薬剤耐性”型であり、それゆえハイブリッドは生き残るが、未融合骨髄腫細胞は選択した媒体中で生き残らない。もっとも普通のクラスは 8-アザグアニン抵抗性細胞系であり、該細胞系はそれは酵素ヒポキサンチングアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼを欠き、それゆえ HAT (ヒポキサンチン、アミノブテリジン、及びチミジン) 媒体により維持されない。また、一般的には、分泌型を用い得るけれども、いわゆる“非分泌”型がそれ自体何等抗体を產生しない。

ない点で、骨髓腫細胞系は“非分泌”型であることが好ましい。しかしながら、所定の場合には分泌骨髓腫系が好ましいかもしれない。

好ましい融合促進剤は平均分子量約1000～約4000を有するポリエチレングリコール(PEG1000等のような市販品)、業界で知られた他の融合促進剤を用い得る。

D. 未融合骨髓腫細胞を維持しない選択した培地中の未融合脾臓細胞、未融合骨髓腫細胞、及び融合細胞の混合物を、別々の容器、例えば、マイクロタイタプレートの別々のくぼみ中で、未融合細胞の死をもたらすのに十分な時間(約14～16日)の間で、希釈しそして培養する。希釈は限定する一つのタイプでよく、そこで希釈剤の容量は統計的に計算されて各々の分離容器(例えば、マイクロタイタプレートの各々のくぼみ)中、一定数の細胞(例えば、1～4)を分離する。媒体は薬剤耐性(8-アザグアニン抵抗性)未融合細胞系を維持しないものである(例えばHAT媒体)。それゆえ、これらの骨髓腫細胞は死ぬ。未

体を回収することによって產生される。好適な媒体及び好適な培養時間長さは知られておりそして容易に決定される。この生体外技術は单クローン性抗体を生じ、抗人免疫グロブリンがない。媒体は異種血清(例えばウシ胎児血清)を含むので、他の免疫グロブリンが少量存在する。しかしながら、单クローン性抗体の濃度はめったに50μg/mlより高くならないので、この生体外の方法はある種の目的用に十分な抗体量または十分な抗体濃度を生じ得ない。

わずかに純度がより低い单クローン性抗体をずっと高い濃度で生成させるには、所望のハイブリドーマクローンをマウス、好ましくは同系または半同系のマウスに移植するわち腹腔内注射し得る。ハイブリドーマは好適な培養時間後、抗体產生腫瘍を形成し、かかる時間はホストマウスの血流及び腹腔浸出物(腹水)中所望の抗体を高濃度(約5-20mg/ml)でもたらすものである。また、これらのホストマウスはそれらの血液及び腹水中に正常な抗体を有するけれども、これらの正常な抗

融合脾臓細胞系は悪性でないので、有限数の世代しか持たない。従って、一定時間(約14～16時間)、これらの未融合脾臓細胞は生殖することができない。一方、融合細胞は、それらが骨髓腫母細胞の悪性の性質及び該選択した培地内で生き残る能力を有するので、再生し続ける。

E. ハイブリドーマを含む各々の容器(くぼみ)中の上澄みを、遊離のhFPAの抗体であってかつ完全なフィブリノゲンまたは人フィブリノベプチドA含有フィブリノゲンフラグメントに非抗体の存在に関して評価し、そして、

F. 所望の抗体を產生するハイブリドーマを選択し(希釈を限定することにより)そしてクローニングを発生させる。

一旦、所望のハイブリドーマが選択されそしてクローニングを発生させると、多分、得られる抗体は二つの方法の内の一つで產生され得る。もっとも純粹な单クローン性抗体を、生体外で、適当な媒体中における所望のハイブリドーマを好適な時間で培養し、ついでクローニングの上澄みから所望の抗

体の濃度は单クローン性抗体濃度の約5%にすぎない。更に、これらの正常な抗体はそれらの特異性において抗人でないので、収穫した悪性の腹水からまたは血清から得た单クローン性抗体は汚染された抗人免疫グロブリンが本質的でない。この单クローン性抗体は高い力値であり、特異性免疫グロブリン：非特異性免疫グロブリンの高い比をもたらす。

遊離hFPAを測定することに関する発明に従うアッセイにおいて、任意の便利な標識、例えば酵素、放射性同位体、色素または蛍光部分を用いることができる。かかるアッセイにおいて、hFPAペプチドまたはそのフラグメント、例えばAα7-16、またはそのTyr誘導体、例えばTyr-Aα7-16を用いることができる。放射性免疫アッセイを用いるときはTyr-hFPAまたはTyr-Aα7-16を用いることが好ましい。

前記アッセイを実行するための本発明に従う試験キットは、少なくとも一つの容器に、本発明に従う单クローン性抗体と標識したhFPA(例えば、

放射性標識した Tyr-hFPA または酵素標識した hFPA) かあるいは、複合化した A  $\alpha$ 7-16, hFPA または hFPAP と本発明に従う標識した单クローニ性抗体 (例えば、酵素標識した单クローニ性抗体) かのいずれかを含む。

本発明を以下の実施例を参照してより詳細に説明するが、本発明はそれらに限定されるものでない。

#### 【実施例】

##### 実施例1

###### A $\alpha$ 7-16デカペプチド [A $\alpha$ 7-16(a)] の合成

###### ペプチド

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Arg

をメリフィールド (Merrifield) 固相法 (エリックソン (Erickson), B.W., メリフィールド, R.B. の蛋白質 (The Proteins), 第2巻、ニューラス (Neurath), H., ヒル (Hill), R.L., (著) : ニューヨーク、アカデックプレス (1976年), p.257) を用いて合成した。

同一のペプチド [A  $\alpha$ 7-16(a)] をバイオサーチ社 (サンラファエロ、カリフォルニア州) より得た。その N-チロシル誘導体 [Tyr-A  $\alpha$ 7-16(a)] を、アブライドプロテインテクノロジーズ (ケンブリッジ、マサチューセッツ州) より得た。また、メリフィールド固相法を用いて合成したペプチド Tyr-A  $\alpha$ 1-21を得た。

##### 合成ペプチドの分析

分析 HPLC により、手作業で製造したデカペプチド [A  $\alpha$ 7-16(a)] は  $R_f = 2.2$  分に (第1図) 単一の主要なピークを示した。A  $\alpha$ 7-16(a) ペプチドは純度が一層低いが、主要なピークをまた  $R_f = 2.1.9$  分に示した。アミノ酸分析及び配列分析 (アブライド・バイオシステム (Applied Biosystems) ・モデル 477A プロテイン・シーケンサー及びアブライド・バイオシステム・モデル 120PTH-アナライザー) からの結果は、両方のペプチドの構造が人 A  $\alpha$ 7-16に一致することを示した。デカペプチドの N-チロシル誘導体を、ムーボンダパック (Bondapak) C<sub>18</sub>カラムを用いた予備 HPLC により精製した。

第1図に示すように、精製したペプチドは  $R_f = 2.7.6$  分に単一のピークを示した。

##### 実施例2

###### ハイブリドーマの免疫化及び製造

それ以上に精製していない、バイオサーチ (サンラファエロ、カリフォルニア州) 社より得た A

$\alpha$ 7-16(a) ペプチドを、カルボジイミド (スタロス (Staros), J.V., ライト (Wright), R.W., スイングル (Swingle), D.M., の "水溶性カルボジイミドの N-ヒドロオキシスルホスクシンイミドを媒介にしたカップリング反応による強化" , Anal Biochem, 156, 220 (1986年) 及びグルタルアルデヒド (ノッセル (Nossal), H.L., ユーデルマン (Yudelman), I., キャンフィールド, R.E., パトラー, V.P., ジュニア, スパンディス (Spanondis), K., ウィルナー, G.D., クレシ (Qureshi), G.D. の "人の血液中のフィブリノペプチド A の測定" , J. Clin. Invest., 54, 43, (1974年) ) 法の両方によりオバルミンに結合させた。

各々の結合操作において、A  $\alpha$ 7-16: オバルミン比は重量を基準にして 1:1 であった。二つの複合体の等容量 (各々 50  $\mu$ l) を 100  $\mu$ l の完全フロイントアジュンバントと混合してそして、BALB/cJ (ジャクソン (Jackson), ラボラトリ一、バー・ハーバー、メイン州) マウスに注入 (i.p.) した。すべての免疫化スケジュールは以下

の通りである：

1日 200  $\mu$  l/マウス(i.p.) 不完全フロイント  
 12日 150  $\mu$  l/マウス(i.p.) 不完全フロイント  
 21日 150  $\mu$  l/マウス(i.p.) 不完全フロイント  
 29日 150  $\mu$  l/マウス(i.p.) 不完全フロイント  
 37日 150  $\mu$  l/マウス(i.p.) 不完全フロイント  
 47日 150  $\mu$  l/マウス(i.p.) 不完全フロイント  
 54日 150  $\mu$  l/マウス(i.p.) 不完全フロイント  
 61日 - - - - - フリ-F (ELISA/Blot 分析)  
 82日 100  $\mu$  l/マウス(i.p.) 不完全フロイント  
 83日 - - - - - 融合

\* 携体蛋白（オバルブミン）に対する最も弱い可能な応答を得るために、また、 $A\alpha 7-16(a)$  ベブチドをカルボジイミド法によりポリ-D-グルタミン酸（ナトリウム塩、モル重量約24.8kDa, シグマ、セントルイス、ミズーリ州）に結合しそして後者を融合の前の最後の追加免疫 (i.v., アジュバントを用いないで) において用いた。二匹のマウスを上記操作により感作した。

抗血清 ELISA 滴定（以下を参照）に基づ

21.89. (1984年) に記載されているのと同様であった。

### 実施例3

#### 前融合 (prefusion) 抗血清及びハイブリドーマ培養培地の試験

前融合抗血清を、ELISAによる力価評価に関してそしてまた免疫プロット分析に関して用いた（以下及び第2図参照）。ELISA操作において、マイクロタイタプレートに未処理の人フィブリノゲン並びに $A\alpha 7-16(a)$ 、hPPAまたはhPPAPのいずれかにより作成したオバルミン複合体を塗布した。また、同様のプレートをハイブリドーマ培養培地をスクリーニングするのに用いた。ポリビニルマイクロタイタプレート（コスター (Coster)、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）の塗布、洗浄、阻止及び抗体の検出はクドリクらの Mol. Immunol., 21, 89. (1984年) において記載された方法と同様にした。

#### 前融合血清の分析

両方の動物の（マウス#1及びマウス#2）か

き、免疫化した動物の一つから脾臍を取り出しそして最終i.v.追加免疫の3日後に融合実験に用いた。また、血清を、この動物よりいかにえにする前に採取した。脾臍細胞を骨髓細胞（P3×63AG 8.653）と、RPMI1640（フロー (Flow)・ラボラトリーズ社、ダブリン、バージニア州）中で製造された50%ポリエチレングリコール（およその分子量=1300-1600、シグマ、セントルイス、ミズーリ州）中約4:1の比で融合した。ポリエチレングリコール/RPMI (1ml) を細胞ベレットに非常にゆっくりと1分間、静かに攪拌しながら添加した。この時間の後、以下のものを示した順序で且つ特定した時間で添加した：1mlのRPMI (1分間)；2mlのRPMI (2分間)；20%の牛胎児血清を含有するRPMI4ml (2分間)；20%の牛胎児血清を含有するRPMI4ml (2分間)。融合操作の残部は（クドリク (Kudryk), B., ローザ (Rohozza), A., アハジ (Ahadi), M., チン (Chin), J., ウィーベ (Wiebe), M.E. の "フィブリノゲンのNH<sub>2</sub>-末端領域に関する単クローニング性抗体の特異性". Mol. Immunol...

ら捕獲した抗血清を、フィブリノゲンまたはフィブリノゲンを塗布したELISAプレート上で初期にスクリーンした。以下の結果を得た：

血清希釈度	マウス#1		マウス#2	
	72A81	72A82	72A81	72A82
1/10	0.105*	1.390	0.142	0.094
1/20	0.171	1.179	0.087	0.056
1/40	0.043	0.843	0.046	0.033
1/80	----	0.546	----	0.019
1/160	----	0.333	----	0.010

\* O.D. の値を引用。酵素結合したIgG結合をクドリクらが Mol. Immunol., 21, 89. (1984年) において記載したように H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及び 4-ジアニシジン溶液を用いて検出した。

上記結果はマウス#2が感作されたことを示しそしてそれが人フィブリノゲン A $\alpha$ -鎖（すなわち A $\alpha$ 7-16領域）の NH<sub>2</sub>-末端部分に対する抗体を產生した公算が大きいことを示している。この同じ領域はフィブリノゲンにおいて消失しているので、フィブリノゲン塗布ELISAプレート上の予期し

得る反応性はあるとしても、極めてわずかであつた。

免疫プロット分析（第2図）はまたマウス#2の抗血清の希釈液（1/250）を用いて行った。比較として、また、同様の方法で希釈した前免疫化血清を用いた。予測した通り、バックグラウンド染色だけが比較の血清により得られた（第2図中央のパネル）。一方、A $\alpha$ 鎖と一致したバンド並びに多くの他のバンドが還元した人フィブリノゲン及びポジティブの抗血清の場合に観測された（第2図の右パネルのレーン2）。A $\alpha$ 鎖は全く異種起源でありそしてこれは血漿からの人フィブリノゲンの精製の間に起こる広範囲なタンパク質分解（A $\alpha$ -鎖のCOOH-末端領域におけるその殆ど）によるものである公算が強いことが十分知られているので、後者の結果が予測された。

ポジティブの血清が犬フィブリノゲンのA $\alpha$ -鎖と反応しなかったことは興味深かった（第2図、右パネル、レーン2）。犬A $\alpha$ 鎖が精製の間に分解しされる度合いはずっと少なくそして、人

16(a)-ポリ-D-Glu [CDI] またはフィブリノゲンのいずれかで塗布したプレートへのわずかな結合を示した。ハイブリドーマの指標及びこれらの7つの細胞系により分泌された抗体の結合特性は以下の通りであった：

<u>ハイブリドーマ</u>	<u>A<math>\alpha</math>7-16(a)-ポリ-D-Glu [CDI] プレート</u>	<u>ハイブリドーマ</u>
9 A 9	1.16*	0.00
8 C 2	> 2.00	0.00
8 D 3	1.61	0.00
9 A 10	0.51	0.00
3 B 5	0.40	0.00
2 E 11	0.25	0.22
8 C 3	0.84	0.00

\* 0 D... 値を引用。酵素連鎖IgG結合はクドリクラが Mol. Immunol. 21, 89, (1984年)において記載したように H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及び0-ジアニシシン溶液を用いて検出した。

A $\alpha$ 7-16(a)-ポリ-D-Glu [CDI] 塗布プレート及びクローン培養液の適当な希釈液を用い

との比較により、犬セグメントA $\alpha$ 7-16は構造においてわずかしか異ならない（A $\alpha$ Asp-7はGluで置き換えられそしてA $\alpha$ Leu-9はIleにより置き換えられる）（ビルケン (Birken), S., ウィルナー, G. D., キャンフィールド, R. T. の“犬フィブリノゲンの構造の研究”, Thromb. Res., 7, 599, (1975年)）。

#### ハイブリドーマ培養培地中の抗体のスクリーニング

良好な細胞成長を、マイクロタイタプレートの極めて多くのくぼみ (503/1152) 中で融合後10-14日で観測した。最初に、培養基を未処理のフィブリノゲンかあるいはA $\alpha$ 7-16(a)-ポリ-D-Glu [CDI] かのいずれかで塗布したプレート上で抗体に関するスクリーニングをした。ELISAにより試験したすべての培地のうち、6個だけがA $\alpha$ 7-16(a)-ポリ-D-Glu [CDI] で塗布したくぼみに結合した抗体を含んでいたが、未処理のフィブリノゲンで塗布したくぼみには抗体が含まれていなかった。一つの培地試料はA $\alpha$ 7-

16(a)-ポリ-D-Glu [CDI] またはフィブリノゲンのいずれかで塗布したプレートへのわずかな結合を示した。ハイブリドーマの指標及びこれらの7つの細胞系により分泌された抗体の結合特性は以下の通りであった：

た、競争ELISAにおいて、ハイブリドーマ8C2及び8C3のみが分泌した抗体を、A $\alpha$ 7-16(a)、hFPAまたはhFPAPの適当な希釈液により中和した。更に、これらの同様の二つのハイブリドーマからの培養液中に存在する抗体だけが<sup>125</sup>I-TYR-hFPA(以下参照)と結合することが可能であった。ハイブリドーマ9A9により分泌された抗体はA $\alpha$ 7-16(a)により中和することができるが、非常に高い濃度のときだけである。

#### 実施例4

##### 腹水の製造、抗体の精製及びイソタイピング

腹水中の抗体のレベルは5~20 mg/mlの範囲であることが知られているので、ハイブリドーマ8C2、8C3及び9A9をBALB/Cマウスの腹腔中で以下のプロトコルを用いて成長させた。マウスに0.5 mlのフロインド不完全アジェントを注入した(i.p.)。(ミューラー (Mueller), U.W., ホース (Haues), C.S., ジョーンズ (Jones), W.R. の“マウス中の抗体を含有する腹水の製造”、免疫学第6回国際会議、(1986年)、トロント、カ

ナダ、(抄録3.15.1))。この刺激作用の1日後、およそ10<sup>7</sup>のハイブリッド細胞を各々のマウスに注入した(i.p.)。腹水を8~12日後に捕収して、Millex-PF 0.8μmフィルタユニット(ミリポア社、ベドフォード、マサチューセッツ州)上で沪過し、NaN<sub>3</sub>で0.1%に調節し、必要とするまで保存凍結した(-70°C)。かかる動物から捕収した腹水中の抗体の力値を、通常、DEAEまたは"BIO-GEL" HPHTカラムを用いてHPLCにより評価した(以下参照)。腹水からの抗体を、"BAKERBOND" ABx (J.T.ベーカー(Baker)ケミカル社、フィリップスバーグ、ニュージャージー州)によるクロマトグラフィーにより精製した。カラム(3.1 cm<sup>2</sup> × 10cm)は10mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 6.0、さらに0.1%NaN<sub>3</sub>を含有するもので平衡にした。

腹水をいくつかの異なる平衡緩衝液に対して透析してそして後に流量20-25 ml/時間でABxカラムにかけた。すべての非吸着物質が溶出した後、等容量の(200 μlの各々の緩衝液)平衡緩衝液及び200mM、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 6.0に0.1%NaN<sub>3</sub>を更に

9-誘導腹水をかかるカラムにより分画したとき、ピークIIの蛋白は他の二つの腹水に関して測定されたものよりもずっと早く溶出した。8C2-誘導腹水から得られたピークIIの蛋白(還元の前及び後)のSDS-PAGE分析は純度が90%より一層良好な抗体であることを示した(第4図)。同様の結果は8C3-及び9A9-誘導腹水の両方からのピークII物質に関して得られた(図示しない)。ABx精製した抗体の免疫グロブリンのイソタイプはMab/8C2及びMab/8C3がIgGであることを示した。

#### 実施例5 免疫プロッティング

ヒト及び犬のフィブリノゲン、架橋したフィブリリン並びに他の蛋白をSDSにおいてアクリルアミドゲル(4-15%勾配ゲル)により電気泳動させた。電気泳動(18-20時間/室温/9mA、一定電流)は、25mMトリス、190mMグリシン、0.1% SDS、pH 8.5を含有する緩衝剤中の勾配アクリルアミドゲルスラブ[36cm(幅) × 36cm(長さ) × 0.75mm(厚さ)]によるものであった。電

含有したものにより構成した線形勾配を用いて回収した。抗体溶出段階においてカラム流量を、10~12ml/時間に低下した。

上で記載した方法により精製したすべての抗体のイソタイプをELISAにより以下の操作を用いて測定した。ポリビニルマイクロタイタプレートをNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>、pH 9.6 中約0.5 μg/mlの濃度の異なる抗体で塗布した。塗布した抗体のイソタイプスクリーニングを、ボーリンジャー・マンハイム(Boehringer Mannheim)(インジアナボリス、インジアナ州)より得られた"スクリーンタイプ"キットを及び操作を用いて達成した。

#### 腹水から回収した抗体の純度及びイソタイプ

第3図は、ハイブリドーマ8C2-誘導腹蛋白の"BAKERBOND" ABxカラムによる溶出プロファイルを示す。また、完全な腹水並びにABx-保持蛋白の分析HPLCプロファイルを示す(ピークII)。8C3-誘導腹水を同様の寸法の"BAKERBOND" ABxカラムにより分画したときに同一のパターンを得た。しかしながら、これとは逆に、9A

気泳動の後、分解した蛋白質のバンドを、17mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、15mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、pH 6.5を用いてニトロセルロースに移動した。移動が完了したとき(2時間/10°C/1.5 A)、ニトロセルロース膜を"NIID"緩衝剤によりブロック(2時間/室温)しそしてその後"NIID"緩衝剤中で作成したポリクローラン性または単クローラン性抗体希釈液のいずれかにより処理した(室温にて18-20時間)。抗体とともに培養した後、膜を、0.05%の"Tween 20(フィッシャー(Fisher)・サイエンティフィック社、スプリングフィールド、ニュージャージー州)を含有するトリス食塩水(pH 7.4)により広範囲に洗浄した。結合した抗体を、マウス免疫グロブリンに対する酵素結合兔抗体(ダコ(DAKO)社、サンタバーバラ、カリフォルニア州)を用いて検出した。色をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及び4-クロロ-1ナフトール(シグマ、セントルイス、ミズーリ州)溶液を用いて検出した(ベイヤー(Beyer)C.F.の"マウス単クローラン性抗体の免疫グロブリン類の測定用のニトロセルロース膜によるA'ドット(Dot)

免疫結合アッセイ" *J. Immunol. Methods*, 67, 79, (1984年)。 MAb/8C2 を用いる免疫プロット分析

予測したように、因子Xa-架橋人及び犬フィブリノゲンからの蛋白質のバンド (第5図、それぞれ、レーン4及び6) はハイブリドーマ8C2のクローニング (サブクローニング#5) により分泌された抗体 (MAb/8C2) を結合させることができなかった。フィブリノゲンの形成はフィブリノペプチドA及びBの損失を含むので、推定の抗フィブリノペプチド抗体の反応性がかかるサンプルにより得られることはあっても極めて少ない。明らかに、かかる抗体との反応の程度はフィブリノゲン形成の間のフィブリノペプチド除去の程度に反比例する。また、第5図に示したように、この抗体は還元した人または犬フィブリノゲンと反応することができなかった (それぞれレーン3及び5)。

更に、カルボジイミドとの結合の前 (レーン9または12) かまたは後 (レーン10) かのいずれかにおいて担体蛋白質との反応性は観測されなかつた。実際に、MAb/8C2-5を結合した唯一のバンド

は、hFPA/ hFPB (レーン11) 及びhFPAP (レーン13) の担体蛋白質-複合体を含有するサンプルから誘導されたバンドであった。

蛋白質またはペプチドのカルボジイミド誘導結合は寸法及び組成において全く不均一の生成物を生じるので、この免疫プロット分析において得られる線状接着効果 (streaking effect) が予測される。しかしながら、もっとも重要なことに、MAb/8C2とフィブリノゲンA  $\alpha$ -鎖との反応を観測できなかつたことは、この抗体による免疫活性に関して、フィブリノペプチドAがそのCOOH-末端に遊離Arg-16を有しなければならないと推論することを導く。カルボジイミドによりいずれかの担体蛋白質に結合したフィブリノペプチドAは遊離NH<sub>2</sub>-またはCOOH-基のいずれかにより共有的に結合していると考えられるので、かかる複合体だけが遊離COOH-末端を持ついくつかのペプチドを有し得る。免疫プロット分析を、他の二つの抗体 (MAb/8C3 及びMAb/9A9) により実施しなかつた。

#### 実験例6

##### ペプチドの放射性標識及び、結合及び競争放射性免疫アッセイ

ペプチドを  $^{125}\text{I}$  で標識しそしてその後、キドルク、B.、ロビンソン (Robinson), D.、ネットレ (Netre), C.、ヘセル, B.、プロムバック, B. の人の血液中の  $B_{\beta} 15-42$  配列を含有するフィブリノゲン/フィブリノゲンフラグメントの測定"、

Throm. Res., 25, 277, (1982) に記載された操作を用いて脱塩を行なつた。

結合及び競合放射性免疫アッセイで4つの区画及び2つの分画培養時間を使用した。これらの第1番目は以下のものの混合を含む: MAb/8C2 またはR-33の適当な希釈液 (緩衝剤A-5で作成した) 100  $\mu\text{l}$  ; 緩衝剤A-5または同じ緩衝剤中で希釈した試験サンプル 100  $\mu\text{l}$  ; 50  $\mu\text{l}$  トレーサー (緩衝剤A-5中で作成した、約25000cpm)。第1の培養を +4°C にて18-20時間行なつた。この時間後、アガロースに複合した抗免疫グロブリン (MAb/8C2 の場合に兔抗マウス及びR-33の場合に

ヤギ抗兔) の適当な希釈液 250  $\mu\text{l}$  を各々のアッセイ管に添加した。第2の培養 (抗免疫グロブリンによる) には、自家製の装置を用いて、2時間、4°Cにてエンド・オーバー・エンド (end-over-end) 混合 (10rpm) することを含めた。これに次いで、すべての第2の抗体を含有する管を遠心分画し (4000G, 10分、+4°C)、冷塩水で3回洗浄しそしてペレットを放射性活性に関してカウントした。

放射性免疫アッセイにより測定したMAb/8C2 の特異性

第6図は、完全な及びトロンビン-消化した  $^{125}\text{I-Tyr-A}\alpha 1-21$  の MAb/8C2-5 への結合を示す。すべての結合実験において、両方の放射性活性リガンドの同一の希釈液を用いた。結合放射性アッセイデータは MAb/8C2-5 がトロンビン-消化した  $^{125}\text{I-Tyr-A}\alpha 1-21$  と反応することを明らかに示した。また、比較のため、完全な及びトロンビン-消化した  $^{125}\text{I-Tyr-A}\alpha 1-21$  をポリクローニ性抗体 (R-33) への結合を、第6図に示し

た。ポリクローン性抗体を、ネセル及び彼の共同研究者により作り、それは以前に、フィブリノゲン及びFPA 含有フィブリノゲンフラグメントと広く交差反応できることを示した（上記のウルナー (Ulner) ら）。

第7図に示した様にMab/8C2-5 及びR-33はトロンビン-消化した  $^{125}\text{I}$ -Tyr- $\alpha$  1-21のみならず Tyr- $\alpha$  7-16(a) 及びTyr- $\alpha$  1-16の  $^{125}\text{I}$ -識別化した形態とも良好な結合を示した。3つのリガンドの結合において相違する理由は特異的な放射性活性が各々の試料に関して変化するという事実による公算が大きい。Mab/8C3 は同様の結合性をもたらし、一方、Mab/9A9 は上記したいずれのリガンドとの結合ができなかった。

#### 実施例7 酵素複合体の製造

ホルセラディッシュペロキシダーゼ（ペーリンガー、マンハイム、インジアナポリス、インジアナ州）を酵素の鎖部分の酸化を含む方法により、hFPA及びMab/8C2 の両方に結合した。hFPAの場合、1.0  $\mu\text{g}$  のペプチドを5.0  $\mu\text{g}$  の酵素に結合し

PBS 中で作成された1/500 希釈液）と緩衝剤A-5B かまたは既知ではあるが可変濃度のhFPA標準物質かまたは未知の試験サンプルかのいずれかの等量物を混合したものとともに培養した。hFPA標準物質または未知の試験サンプルを緩衝剤A-5B中で希釈する。TPBSによる洗浄サイクル（100  $\mu\text{l}$ 、3回）に続き、市販の基質-色素（TMB, 3,3',5,5'-テトラメチルベンジン）溶液（キルケガード (Kirkegaard) 及びペリー (Perry) - ラボラトリーズ社、ガイセルバーグ (Gaithersburg)、メリーランド州）を各々のくぼみに加えそしてプレートを静かに振拌しながら15分間室温で培養する。発色はくぼみ当たり50  $\mu\text{l}$  1N HClを加えることによって抑制そして色強度をマイクロエライサ (microelisa)・オートリーダーを用いて自動的に測定する (450nm)。

Mab/8C2-5 及びhFPA-HRPO を用いる、hFPAに関するELISA操作の要約は以下の通りである：

ステップ # 1：

ポリビニルプレートにMab/8C2-5 の1/1000希

た。Mab/8C2-HRPOの製造において、5  $\mu\text{g}$  の抗体を10  $\mu\text{g}$  の酵素に結合した。両方の複合体の製造に関して用いたプロトコルは、ゴディング (Goding), J. W. の 单クローン性抗体：原理と実施 (第2版)、ニューヨーク、アカデミックプレス、(1986年)、p83.の記載にわずかだけ修正を加えた。

#### 実施例8

#### Mab/8C2 をhFPA-HRPO とともに用いる競合ELISA操作

ポリビニルマイクロタイタプレートを、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>、pH9.6 中約0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度のMab/8C2 100  $\mu\text{l}$  で塗布する。一般に、プレートを+4°Cにて一晩塗布する。しかしながら、抗体塗布プレートは2~3時間の短時間で調製できる。次いで、塗布したマイクロタイタプレートを緩衝剤A-5Bにより“ブロック”（室温で15分間）する。この時間後、プレートをTPBS (0.05%の“TWEEN”20を含有するPBS) により洗浄し（100  $\mu\text{l}$ 、3回）、そしてその後、固定濃度の hFPA-HRPO (

50  $\mu\text{l}$  で一晩塗布する。一般的に、プレートを4°Cで一晩塗布する。しかしながら、抗体を2~3時間で塗布できる。

#### ステップ # 2：

プレートを0.1%のオバルブミンを含有するPBSでブロックする。

#### ステップ # 3：

プレートをTPBSで2回洗浄する。

#### ステップ # 4：

hFPA標準物（または未知）の希釈液を、0.1%オバルブミンを含有する新規に作成したPBS中で作成する（緩衝剤中でアジ化物を使わない）。

#### ステップ # 5：

hFPAの各々の希釈液を、等量のhFPA-HRPO 複合体の1/500 希釈液と混合する。複合体を、PBSのみにおいて使用する直前に希釈する。混合後、100  $\mu\text{l}$  のhFPA及びhFPA-HRPO 溶液をくぼみに加える（各々のhFPA標準物質または未知の試料に関して2-4のくぼみ）。

室温で振り混ぜながら室温で30分培養する。

## ステップ#6:

プレートをPBSにより3回洗浄する。

## ステップ#7:

基質-色素50μl/(孔)を、TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)マイクロウェル・ペロキシダーゼ基質及びペロキシダーゼ溶液の等量よりなるKPL試薬(キルケガード・アンド・ベリー・ラボラトリーズ社、ガイセルスバーグ、メリーランド州)を用いて加える。振り混ぜながら15分間、室温で培養する。

## ステップ#8:

反応を、1N HCl 50μl/(孔)を添加して停止する。

## ステップ#9:

450nmでの色を読みとる。色は安定である。

hFPA-HRPOとMab/BC2を用いる競合ELISA  
Mab/BC2-5とhFPA-HRPOを用いるELISA  
によるhFPA標準曲線

## 450nmでの吸光度

hFPA標準物 (ng/ml)*	7#1 1	7#1 2	7#1 3
400.0	0.102	0.128	0.123
	0.098	0.128	0.141
200.0	0.136	0.190	0.192
	0.152	0.194	0.218
100.0	0.209	0.288	0.266
	0.240	0.284	0.288
50.0	0.293	0.377	0.358
	0.348	0.413	0.357
25.0	0.374	0.460	0.385
	0.420	0.477	0.413
12.5	0.406	0.532	0.447
	0.410	0.511	0.456
6.25	0.401	0.524	0.456
	0.441	0.548	0.450
緩衝剤のみ	0.515	0.628	0.473
	0.506	0.589	0.484
	0.502	0.606	0.489
	0.494	0.590	0.510

\*モル濃度では、hFPA投与量は $2.6 \times 10^{-7}$ (400ng/ml)~ $4.1 \times 10^{-8}$ (6.25ng/ml)であった。

典型的な標準カーブを第8図に示す。

## 実施例9

Mab/BC2-HRPOを用いる競合ERIZA操作

このアッセイにおいてマイクロタイタプレートを、Aα7-16(a)、hFPAまたはhFPApのいずれかにより作成したオバルブミン複合体で塗布した。かかる複合体上の存在する“活性”な抗体-結合ペプチドの数を評価することは困難であったが、すべてでないとしても、殆どのペプチドは複合体の製造の間にオバルブミンに共有的に結合することが求められた。プレートを塗布するために、かかる複合体を普通1.5-0.5μg/mlの範囲内で希釈し(濃度はオバルブミンに関し、希釈はNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6中です)そしてくぼみ当たり100μlを加える。一般には、かかるプレートを+4°Cで一晩塗布する。アッセイにおいて、Mab/BC2-HRPOのペプチド-抗体蛋白質プレートへの結合を、標準または試験ペプチド溶液を添加すること

によって抑制する。培養、洗浄、基質-色素溶液及びすべての他の操作はhFPA-HRPOを用いる競合ELISAに関する上の記載と同様である。典型的な標準曲線を第9図に示す。

本発明は、本発明の思想または本質的な特性から離れることなく、他の特定な形態で具体化することができ、従って、発明の範囲を示すものとして、前記の詳細な説明よりも特許請求の範囲を参照すべきである。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、合成ペプチドAα7-16(a)、Aα7-16(a)及びTyr-Aα7-16(a)のHPLC(μ-ポンダバックカラム)溶出プロファイルを示す。最初の二つのペプチドの約3μg及びTyr-Aα7-16(a)の約1μgを分析実験用に注入した。

第2図は、SDS中アクリドアミドゲル(7.5-15%勾配)による、還元した蛋白質(人フィブリノゲン(レーン1))及び犬フィブリノゲン(レーン2))の電気泳動パターンを示す。

移動後、膜を、蛋白質（左パネル）に関して染め、前免疫マウス血清（中央パネル）または  $A\alpha-7-16(a)$  デカペプチドのオバルブミン複合体により免疫にした動物（マウス#2）の血清により処理した。比較の同一の希釈液（1/250）及びポジティブの血清を用いた。特異性抗体結合蛋白質バンドはペルオキシダーゼが複合した、マウス免疫グロブリンに対する兔抗体、H<sub>2</sub>O、及び4-クロロ-1-ナフトールを用いて検出した。

第3図は、“BAKERBOND” ABx（中央のパネル）を用いて腹水からのMab/8C2-5抗体を精製した結果を示す。完全な腹水（上方のパネル）及びABx-ピークII物質（下方のパネル）のHPLCプロファイルを、“バイオーグル”ヒドロキシルアバタイトカラムにより得た。

第4図は、ウェバー（Weber）及びオスボーン（Osborn）のSDS-リン酸塩連続緩衝剤システムを用いるSDS-PAGE（SDS中のポリアクリドアミドゲル電気泳動）の結果を示す。低分子量マーカー蛋白質混合物を電気泳動した（左

ルバーグ、ミズーリ州）：（レーン3）還元したhFbg；（レーン4）還元したhXL-Fn；（レーン5）還元したdFbg；（レーン6）還元したdXL-Fn；（レーン9）オバルブミン；（レーン10）オバルブミン[CDI]；（レーン11）hFPA/hFPB-オバルブミン[CDI]；（レーン12）人フィブリノーゲンからのフラグメントE；（レーン13）hFPA-hFg-E[CDI]。レーン2、7及び8にはサンプルを加えなかった。分画及びニトロセルロースへの電気泳動的移動後、膜を、蛋白質について染色する（左のパネル）かあるいは最終濃度約2μg/mlのMab/8C2-5で処理する（右のパネル）とした。特異性抗体-結合蛋白質バンドはマウス免疫グロブリンに対する、ペロキシダーゼを複合した兔抗体、H<sub>2</sub>O、及び4-クロロ-1-ナフトールを用いて検出した。第6図は、トロンビンによる消化の前及び後におけるMab/8C2-5の<sup>125</sup>I-Tyr- $A\alpha 1-21$ による種々の希釈液を用いる、2プロット形式での、結合放射性免疫アッセイの結果を示す（上側プロット図）。好適な培養時間後、リガンド結合抗体

のゲル）。マーカー蛋白質は、ファーマシア（Pharmacia）ビスキャタウエイ、ニュージャージー州）からのものであり、フォスホリラーゼB（94kDa）、アルブミン（67kDa）、オバルブミン（43kDa）、カルボン酸アンヒドラーーゼ（30kDa）、トリプシンインヒビター（20.1kDa）及びラクトアルブミン（14.4kDa）よりなるものであった。

DTTで還元する前及び後におけるAB<sub>x</sub>×ピークII物質（第3図参照）を、それぞれ、中央及び右のゲル中に示した。

第5図は、SDS中のアクリルアミドゲル（7.5→15%勾配）上の電気泳動パターンを示す。使用したサンプルは、（レーン1）ミオシンH-鎖（200kDa）、フォスホリラーゼB（97.4kDa）、BSA（68kDa）、オバルブミン（43kDa）、 $\alpha$ -キモトリプシノゲン（25.7kDa）、 $\beta$ -ラクトーグロブリン（18.4kDa）及びリソジム（14.3kDa）からなる染色する前のマーカー蛋白質混合物（ベテスダ（Bethesda）・リサーチ・ラボラトリーズ、ガイセ

を、反応混合物から、Affi-Gel 10（バイオーランド・ラボラトリーズ、リッチモンド、カリフォルニア州）-不溶化した兔抗マウス免疫グロブリンを用いて分画した。比較のためポリクローニ性兔抗FPA血清（R-33）及び<sup>125</sup>I-Tyr- $A\alpha 1-21$ による、消化の前及び後において得られた結果を示した（下側プロット図）。後者の場合、リガンド結合抗体を、反応混合物から、アガロース不溶化ヤギ抗-兔免疫グロブリンを用いて分画した。抗血清R-33を、ノセル及び彼の共同研究者により調製し、それは完全なフィブリノーゲン及びFPA含有フィブリノーゲン含有フラグメントと広範囲の交叉反応性を示した（ウイルナーら、バイオケミストリー、15,1209, (1976年)）。

第7図は、Mab/8C2-5及びポリクローニ性FPA抗血清R-33（第6図参照）とともに3つの異なるリガンドを用いる結合放射免疫アッセイの結果を、2プロットの形式で示す。用いた操作は、第6図に示したデータの実験に関する操作と同様であったが、種々のトロンビン消化した<sup>125</sup>I

I - Tyr-A  $\alpha$  1-21を用いた。

hFPAレベルを表わす。

第8図は、ELISAより得られたhFPAとMab/8C2-5との間の反応性を示す標準的な投与量-応答曲線である。競合免疫アッセイ操作は、Mab/8C2-5塗布プレート及び示したモル濃度のhFPAと混合したhFPA-HRPの固定希釈液を用いた。応答データをロジット変換により線形化した。この図に含まれる水平領域は、ノセルラ、J.Clin.Invest. 54, 43(1974年)により見出されたように明白な脱纖維素を持つ患者におけるhFPAレベルを表わす。

第9図は、ELISAにより得られた、hFPAとMab/8C2-5との間の反応性を示す標準的な投与量-応答曲線である。競合免疫アッセイ操作は、hFPAP-hFg-E(CD1)-塗布プレート及び示したモル濃度のhFPAと混合した固定Mab/8C2-HRPを用いた。応答したデータを、ロジット変換により線形化した。この図に含まれる水平領域は、ノセルラ、J.Clin. Invest. 54, 43(1974年)により見出されたような明白な脱纖維素を持つ患者における

代理人の氏名

倉内基



同

風間弘志

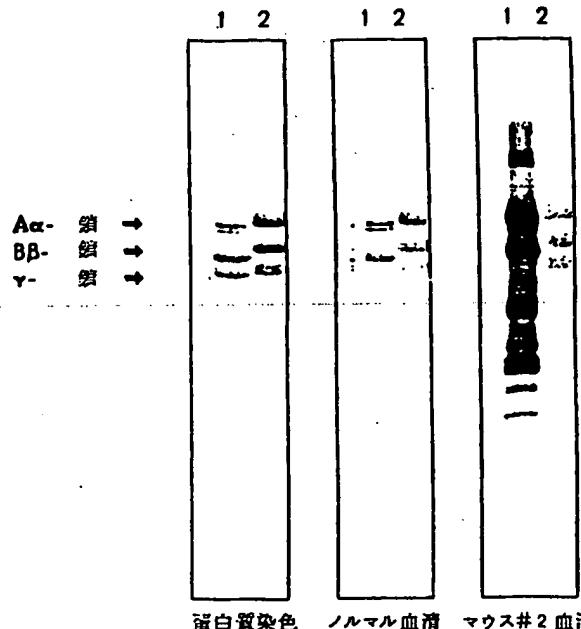
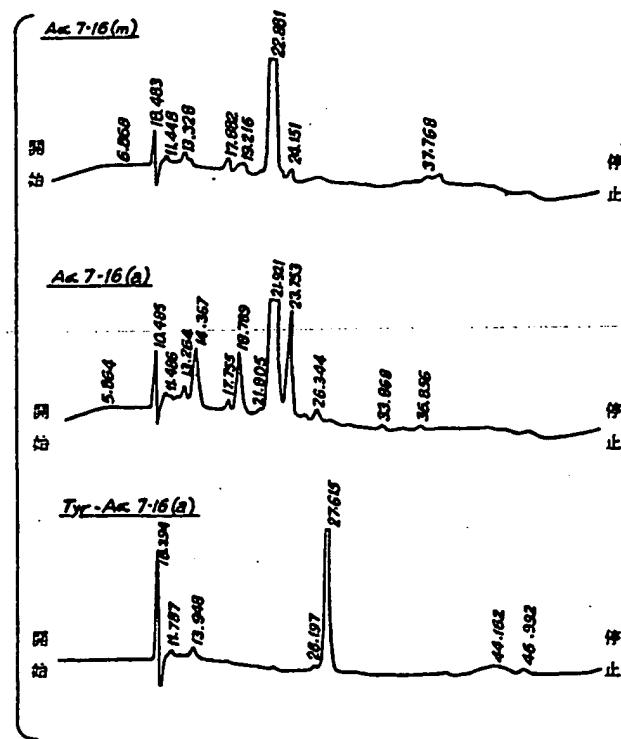


FIG.2

FIG.1

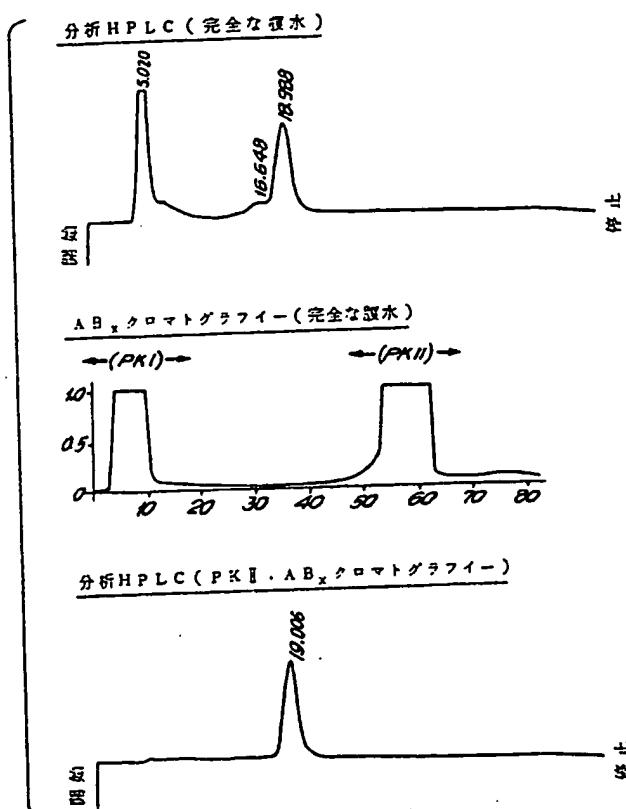


FIG. 3

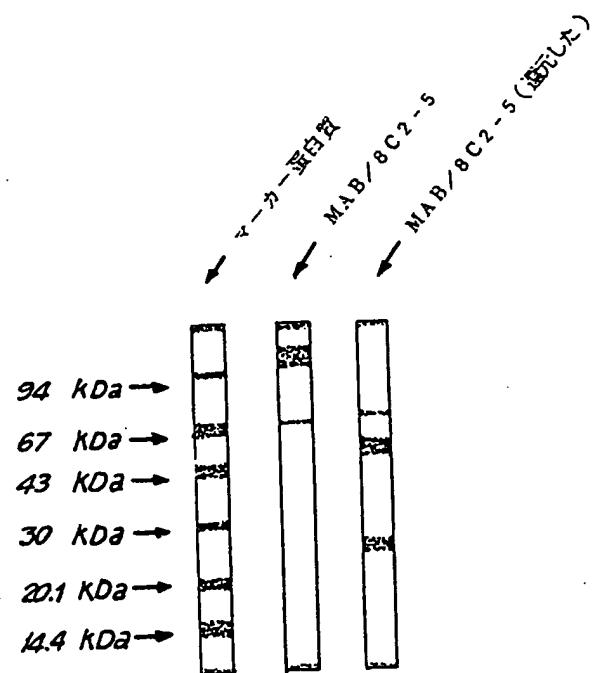


FIG. 4

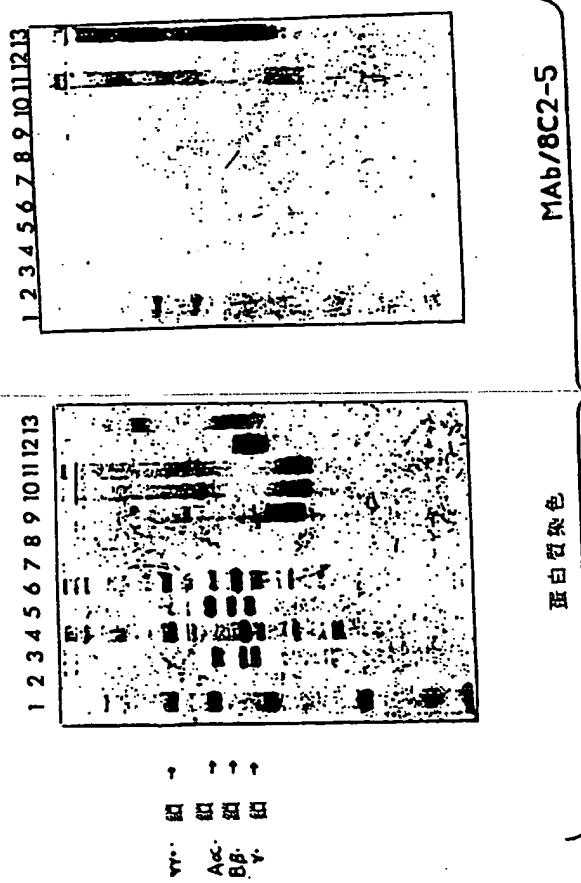


FIG. 5

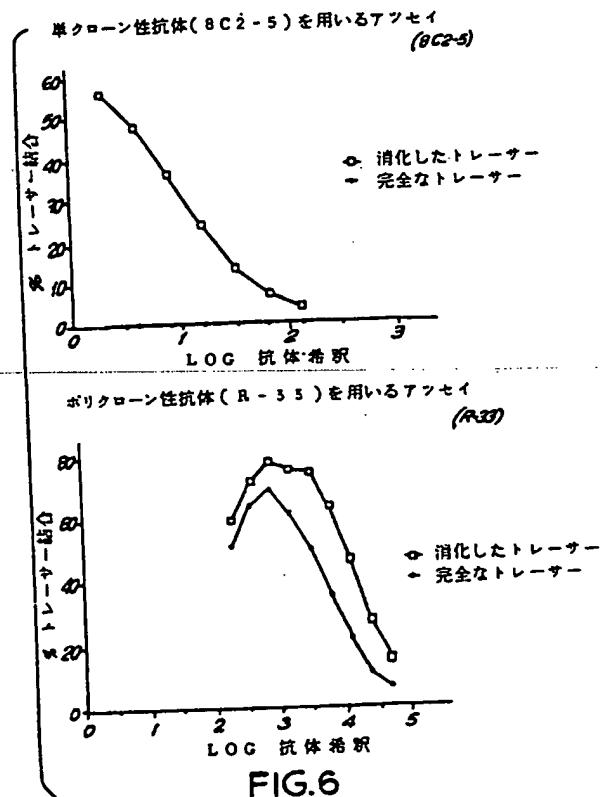


FIG. 6

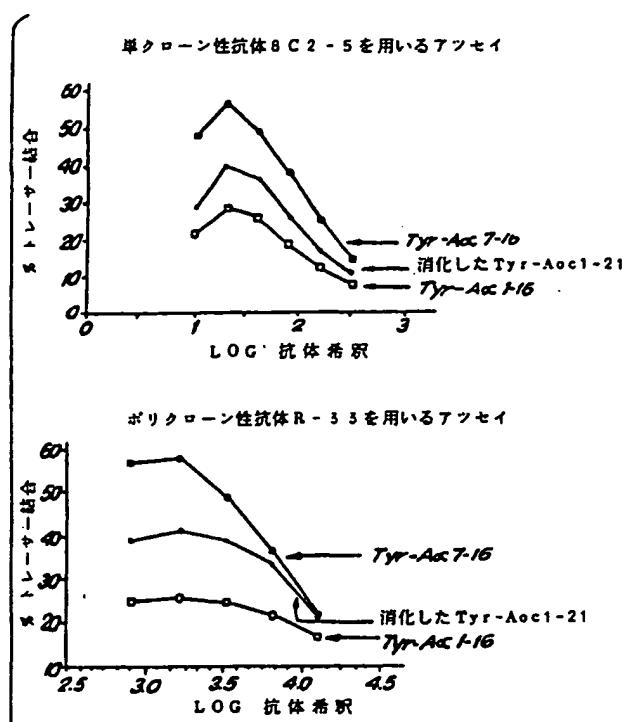


FIG.7

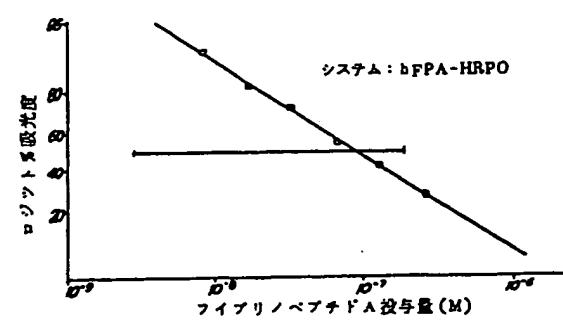


FIG.8

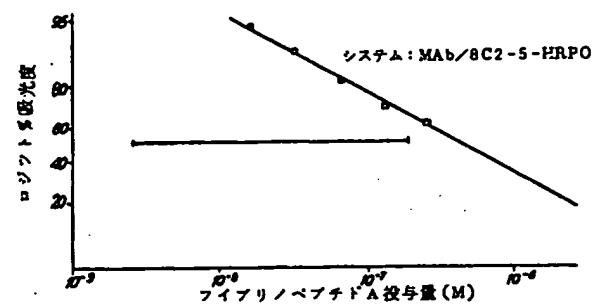


FIG.9